昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

文章编号：0454-6296（2000）增刊-0013-07

几种杀虫药剂敏感蚊类酯酶多态性的研究

陈丽平，乔传令*

（中国科学院动物研究所，农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100080）

摘要：通过蚊虫酯酶蛋白的淀粉凝胶电泳分析和基因组 DNA 的限制性酶切片段长度多态性（RFLPs）比较，对尖音库蚊 *Culex pipiens*、三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhynchus* 和中华按蚊 *Anopheles sinensis* 有机磷杀虫药剂敏感种群的酯酶蛋白和结构基因的多态性进行分析。发现在蛋白质水平上，三带喙库蚊敏感种群（$n=54$）在酯酶 α 和 β 位点分别存在 2 个和 3 个等位基因，在 DNA 水平上有 2.9% 的个体具有与酯酶 $\beta 1^1$ 基因 1.3 kb cDNA 片段同源的 1.3 kb 单拷贝带存在。发现中华按蚊敏感种群（$n=50$）中具有低活性的非特异性酯酶存在，在蛋白质水平上，酯酶 α 和 β 位点各有一个等位基因；在 DNA 水平上，通过对单个蚊虫基因组 DNA 的研究未发现有与酯酶 $\beta 1^1$ 基因同源的酯酶编码基因的存在。对尖音库蚊北京敏感种群（$n=64$）的研究发现，在酯酶 α 和 β 位点都存在 5 个等位基因，在 DNA 水平上，使用一个限制性内切酶（*Eco*RI），15 只蚊虫的样本在酯酶 β 位点发现了 5 个等位基因，说明在尖音库蚊北京敏感种群的酯酶 β 基因周围存在着较大的中性多态性，在有机磷杀虫剂的选择下，这些中性多态性可能会成为基因扩增的潜在因素。

关键词：蚊虫；酯酶；有机磷杀虫剂；限制性酶切片段长度多态性；基因扩增；迁移
中图分类号：Q961　　　**文献标识码**：A

在大多数生物中，酯酶的多态性都很高[1]，库蚊的酯酶是迄今为止已知的多态性最高的蛋白之一，库蚊酯酶多态性的现象普遍存在于敏感蚊虫种群中[2]。

库蚊中酯酶 Est β 基因的限制性内切酶酶切图谱表明：不同 Est β 基因的限制性酶切位点有很大的差别[2,3]。如采自美国加州的库蚊种群中，一个扩增的和一个非扩增的 Est β 基因的限制性酶切位点仅有 21% 相同；采自比利时的一个库蚊种群中，随机选取两个非扩增的 Est β 基因，用 6 种限制性内切酶分析，发现二者有 60% 的酶切位点不同；仅用一个限制性酶分析，Raymond 等从采自三个不同地区的库蚊种群（$n=30$, 72 和 28）中分别鉴定出 15, 24 和 13 个不同的 Est β 的等位基因[2,3]。Guillemaud 等[4]对 Est α 基因的序列分析发现其编码区和非编码区的多态性竟高于果蝇中多态性最丰富的基因座。多态性的估计事实上还是很保守的，因为：①可能有一些共迁移的酶被认为是一个等位酶，事实上迁移率相同的酯酶可能代表不同的等位基因；②库蚊中的 Est α 和 β 基因位点都存在哑等位基因，在进行多态性估计时，所有的哑等位基因都被认为是同一个等位基因；③DNA 多态性检测中只用了少数的限制

基金项目：国家自然科学基金资助项目（N：39840004）
收稿日期：1999-10-10；修订日期：2000-01-24

酶，其实至少有13种酶可用于估计酯酶Est β基因的多态性；④用更精确的分子量标准和更长以及不同浓度的凝胶，可能会检测到更多的电泳条带。Qiao的研究[10]显示至少两个扩增为同一起源，之后经迁飞传播到世界各地。这个假设是基于：在敏感蚊虫酯酶β结构基因周围有较多的中性多态性的存在，以及不同地理区域的种群相同扩增基因型的存在。为了证实迁飞假设的确实性，本文主要研究分析了3个敏感蚊虫种群酯酶基因型多态性以及围绕β座的DNA多态性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 蚊虫品系：中华按蚊 *Anopheles sinensis* 敏感品系：山东省寄生虫病防治研究所甄天民教授赠送，一般称中华按蚊上海株，室内传代已达100代以上，为敏感品系；三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhynchus* 敏感品系：实验室敏感品系，军事医学科学院流行病研究所赠送；淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* 北京敏感品系：实验室品系，对多种有机磷杀虫剂敏感，室内培养30年以上，军事医学科学院流行病研究所赠送；

1.1.2 实验参考系：Tem-R系：致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* 酯酶 $\beta 1^1$ 的标准品系。1994年采集于美国加州野生品系繁衍而来，近来已被证明为酯酶 $\beta 1^1$ 过量产生的纯合型品系[5]。Selax系：致倦库蚊，酯酶 $\alpha 2/\beta 2$ 的标准品系，来源于美国加州野外有机磷抗性库蚊种群[6]。以上所有的标准系均系法国科学院科学与进化研究所Raymond博士惠赠，液氮速冻后，−70℃冰箱中保存备用。

1.1.3 材料：质粒pUC19，酯酶 $\beta 1^1$ 1.3 kb cDNA片段的来源[7]由Raymond博士惠赠。淀粉，法国科学院科学与进化研究所产品；琼脂糖、低熔点琼脂糖，Sigma公司产品；限制性内切酶为华美公司产品；[α-^{32}P]-dCTP为北京市亚辉生物公司产品。

1.2 方法

1.2.1 淀粉凝胶电泳：参照Pasteur等[8]方法，采用Tris-Maleate-EDTA缓冲液系统，测定单个蚊虫的酯酶活性。对照品系为Tem-R，酯酶 $\beta 1^1$；Selax，酯酶 $\alpha 2/\beta 2$。

1.2.2 单个蚊虫RFLP分析：参照Raymond等[7]方法提取单个蚊虫基因组DNA，将单个蚊虫置于一只Eppendorf管中，加150 μL缓冲液A［1% SDS，50 mmol/L Tris-Cl（pH 8.0），25 mmol/L NaCl，25 mmol/L EDTA（pH8.0）］中，研磨后置65℃保温1 h，加入100 μL的缓冲液B（3 mol/L NaAc）中，混匀后冰上放置1 h，12 000 g离心10 min，将上清转入一新的离心管，加入2倍体积的无水乙醇，−20℃沉淀1 h以上，12 000 g离心10 min收集沉淀，用70%乙醇洗一次，真空干燥，而后以10 μL TE溶液溶解DNA，置于−20℃保存备用。

1.2.3 Southern杂交[7]：DNA经酶切，电泳Southern转移后，与标记的1.3 kb酯酶cDNA $\beta 1^1$ 的探针杂交。同样用 *Eco*RI 酶切已知基因型的1～5 μg酯酶 $\beta 1^1$（Tem-R），酯酶 $\alpha 2/\beta 2$（Selax）DNA作为对照。

2 结果

2.1 三带喙库蚊

2.1.1 酯酶的蛋白质鉴定：通过对 28 只三带喙库蚊单个蚊虫酯酶的淀粉电泳显示（图 1），其个体中酯酶的活性是很低的，符合敏感品系酯酶的特征。其中 25 只蚊虫中既有酯酶 α，又有酯酶 β，即酯酶 α 和 β 是连锁出现的，其酯酶 α 的电泳迁移率与酯酶 α2 的迁移率相似，酯酶 β 的电泳迁移率大于酯酶 β2 的迁移率。从酯酶 α 和 β 带的电泳迁移率分析，该酯酶并非是酯酶 α2，因为酯酶 α2 总是和酯酶 β2 同时出现，它们是紧密连锁的[9]。与目前已发现的蚊虫中其它的高活性酯酶 α4/β4、α5/β5 和目前可找到的材料比较分析，该品系中出现是一种新的酯酶，有待于进一步研究。由淀粉电泳的结果可以看出，三带喙库蚊实验室敏感品系中的酯酶是低活性的非特异性酯酶。

2.1.2 三带喙库蚊单个蚊虫酯酶 β 单基因型的特征：由于从单个蚊虫中提取的基因组 DNA 量较少，所以只选用一个限制性内切酶（*Eco*RI）进行单酶切。70 只三带喙库蚊单个蚊虫分别用 DNA 经 *Eco*RI 酶切后电泳、转膜，以酯酶 β1[1] 的 1.3 kb cDNA 片段为探针杂交，结果见图 2，酯酶 β1[1] 单基因型产生一条 2.1 kb 的扩增片段，酯酶 β2 单基因型产生一条 9 kb 的扩增片段。有 2 只三带喙蚊虫的非扩增单基因型中有一条 1.3 kb 的带，仅占群体的 2.9%。它的片段长度与来自委内瑞拉的 PUNTA 野外种群中的一个单个蚊虫酶切（*Eco*RI）后与 β1[1] 探针杂交所产生的 1.3 kb 带是扩增的[10]。三带喙库蚊 Southern 杂交结果证明该种群的蚊虫具有低活性的非特异性酯酶，与酯酶淀粉凝胶电泳的结果一致（图 2）。

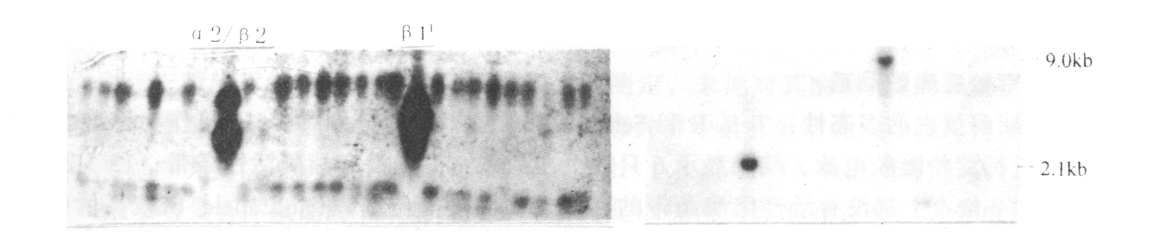


图 1　三带喙库蚊敏感种群单个蚊虫淀粉凝胶电泳，酯酶活性染色结果

Fig. 1　Esterase of individuals of *Culex tritaeniorhynchus* by starch gel electrophoresis

Selax 为高活性酯酶 α2/β2 的参照（Selax shows esterase α2/β2）；

Tem-R 为高活性酯酶 β1[1] 的参照（Tem-R shows esterase β1[1]）

图 2　三带喙库蚊敏感种群单个蚊虫基因组 DNA Southern 杂交的结果

Fig. 2　The result of single mosquito genomic DNA hybridized with Est β1[1] cDNA probe in *Culex tritaeniorhynchus*

分别以 Selax 和 Tem-R 品系作为酯酶 β2 和 β1[1] 的参照

Selax refers amplified Est β2 gene;

Tem-R refers amplified Est β1[1] gene

2.2 中华按蚊

2.2.1 生物测定：使用 0.1×10^{-3}mg/mL 的 DDVP，中华按蚊的死亡率为 91%。

2.2.2 酯酶蛋白质的鉴定：对 50 只中华按蚊单个蚊虫的酯酶进行淀粉电泳分析显示，所有的蚊虫都同时具有以 α-乙酸萘酯和 β-乙酸萘酯为底物的两种酯酶 α 和 β，即酯酶 α 和 β 紧密连锁，其电泳迁移率与现已发现的蚊虫中所有的高活性酯酶都不相同（图 3）。从染色结果上看，中华按蚊中的酯酶活性很低，符合敏感种群的特征。从蛋白质水平分析其 α 和 β 酯酶座

位上的等位基因分别只有一个。

2.2.3 中华按蚊单个蚊虫酯酶β单基因型的特征（图4）：56只中华按蚊的单个蚊虫基因组DNA经*Eco*RI单酶切后，与酯酶$\beta1^1$ 1.3 kb cDNA探针杂交，未见有与$\beta1^1$基因同源的酯酶基因条带出现。

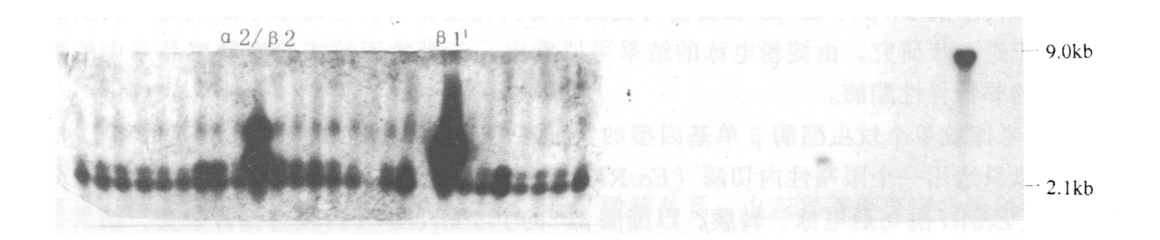


图3 中华按蚊敏感种群单个蚊虫淀粉凝胶电泳，酯酶活性染色结果
Fig. 3 Esterase of individuals of *Anopheles sinensis* by starch gel electrophoresis
Selax为高活性酯酶α2/β2的参照
(Selax refers esterase α2/β2);
Tem-R为高活性酯酶$\beta1^1$的参照
(Tem-R refers esterase $\beta1^1$)

图4 中华按蚊单个蚊虫基因组DNA Southern杂交的结果
Fig. 4 The result of single mosquito genomic DNA hybridized with Est $\beta1^1$ cDNA probe in *Anopheles sinensis*

2.3 北京敏感库蚊品系

2.3.1 酯酶蛋白的多态性：Tem-R和Selax品系蚊虫匀浆后分别稀释10倍作为标准。共64只蚊虫进行淀粉凝胶电泳，结果显示6只蚊虫在酯酶β位点没有酯酶活性条带；13只蚊虫在酯酶α和β位点上都没有活性酯酶条带的存在，表明哑等位基因(null allele)以较高的频率出现，而且哑等位基因在α、β两个酯酶位点是纯合的。然而，这也可能表示该品系中存在低活性的酯酶。从其余的蚊虫中，在酯酶α和β位点各发现了4个等位基因。所有带都不表现高活性酯酶的存在，有5只蚊虫具有与酯酶$\beta1^1$相同电泳迁移率条带，占种群的9.4%(图5)。

2.3.2 单个蚊虫酯酶β单基因型的特征（图6）：北京敏感品系单个蚊虫基因组DNA经*Eco*RI酶切，与酯酶$\beta1^1$ 1.3kb cDNA探针杂交，结果显示酯酶$\beta1^1$单基因型产生一条2.1 kb的扩增片段，酯酶β2单基因型产生一条9 kb的片段。北京敏感种群中所有的带强度都很低，表明没有抗性种群中常见的高拷贝数的扩增基因的存在。8个个体（1，2，3，4，5，6，8，10）中分别存在两条带，其中的一条带与酯酶$\beta1^1$基因单基因型相同的2.1 kb的单拷贝带；另5个个体中（7，9，11，12，13）仅有一条带，这一结果与淀粉凝胶的结果是一致的。在淀粉电泳中仅发现5只蚊虫有酯酶$\beta1^1$存在，相对数量较少，但这可能与敏感品系中酯酶本身活性低及淀粉电泳的分辨率不高有关。从Southern杂交的结果看，北京敏感品系蚊虫中不存在与酯酶β2单基因型相同的9 kb带。用$\beta1^1$探针杂交发现在北京敏感蚊虫中共存在5个$\beta1^1$的等位基因，分别为2.1 kb，2.7 kb，3.3 kb，4.1 kb，6.7 kb。从北京敏感单个蚊虫基因组DNA研究中可知：北京敏感蚊虫中酯酶$\beta1^1$单基因型是单拷贝的，同一种群中不同个体间拷贝数没有差异，围绕酯酶$\beta1^1$基因有一大的多态性存在。

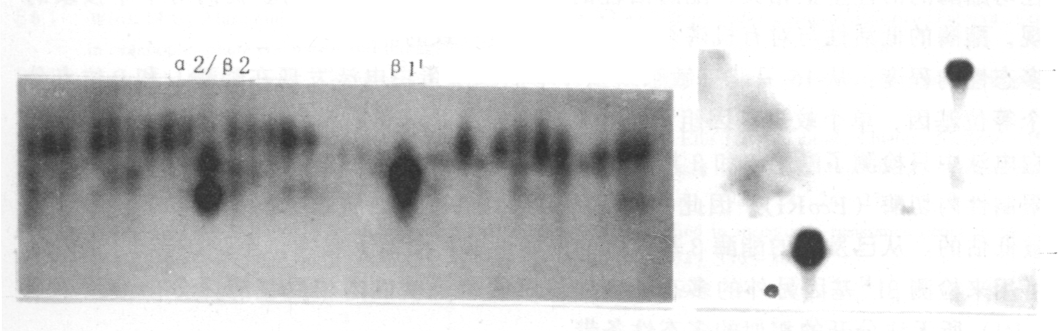


图 5　北京敏感种群单个蚊虫淀粉凝胶电泳，酯酶活性染色结果

Fig. 5　Esterase of individuals from Beijing susceptible strain by starch gel electrophoresis

Selax 为高活性酯酶 α2/β2 的参照

(Selax showing esterase α2/β2);

Tem-R 为高活性酯酶 $\beta1^1$ 的参照

(Tem-R showing esterase $\beta1^1$)

图 6　北京敏感种群单个蚊虫基因组 DNA Southern 杂交的结果

Fig. 6 The result of single mosquito genomic DNA hybridized with Est $\beta1^1$ cDNA probe in Beijing susceptible strain

3　讨论

(1) 对于三带喙库蚊抗药性的研究仅限于生物测定，未见对其酯酶蛋白和结构基因研究的报道。我们实验的结果证实了在三带喙库蚊的敏感种群中具有低活性的非特异性酯酶存在，由于供试样品中只有 2.9% 的个体显示具有与酯酶 $\beta1^1$ 1.3 kb cDNA 片段同源的条带，故可认为此种蚊虫中与尖音库蚊酯酶 $\beta1^1$ 基因同源的基因是以极低的频率存在的。三带喙库蚊酯酶淀粉电泳中显示的较高频率的酯酶 β (61%)，可能是由于尖音库蚊酯酶 $\beta1^1$ 基因同源性较低的基因编码的。在分类学上，三带喙库蚊和尖音库蚊复组库蚊同属库蚊属、库蚊亚属，但不同种[11]。由于三带喙库蚊在分类地位上与尖音库蚊复组蚊虫有一定的距离，使用 $\beta1^1$ 基因探针杂交可能同源性较差。

从酯酶的淀粉电泳结果及单个蚊虫基因组 DNA 的 RFLP 分析结果来看，由于三带喙敏感蚊虫种群中的酯酶迁移率与已知的高活性酯酶有很大差异，且 DNA 的分析也表明其酯酶 β 的编码基因与酯酶 $\beta1^1$ 的编码基因同源性很低，因此我们认为，三带喙库蚊敏感种群中的低活性酯酶是两种新的酯酶，且其酯酶 α 和 β 连锁出现，我们暂将其定名为 α9/β9。

(2) 中华按蚊属蚊科、按蚊属，初步分析其原因为中华按蚊在分类地位上与尖音库蚊相距较远，故其编码 β 族酯酶的基因同源性较差。我们的结论与根据形态学特征进行的蚊虫分类结果一致[11]。虽然中华按蚊敏感品系中存在着以 β-乙酸萘酯为底物的 β 族酯酶，但由于在 DNA 水平上与尖音库蚊的 β 酯酶有很大不同，故可推断其酯酶在分子结构及理化特征上也会有很大不同，其酯酶结构基因有待进一步研究。联系酯酶淀粉电泳的结果，我们认为，中华按蚊敏感种群中存在的酯酶是一种新的酯酶，而且其酯酶 α 和 β 是紧密连锁的。

在昆虫中，酯酶是已发现的多态性最丰富的蛋白质之一[2]。在库蚊中，已证明有机磷杀

虫剂的抗性与酯酶的活性呈正相关，酯酶活性的升高伴随着抗性的增加。我们对中华按蚊的研究也发现，酯酶的低活性与对有机磷杀虫剂敏感性是一致的。

（3）多态性的程度：从 15 只北京敏感蚊虫样本的酯酶蛋白电泳发现在酯酶 α 和 β 位点分别存在 4 个等位基因，单个蚊虫基因组 DNA 的 RFLP 分析发现了 5 个酯酶 $\beta 1^1$ 的等位基因。由于在蛋白电泳中只检测了酯酶 α 和 β 共同迁移的酯酶等位基因及在检测 DNA 多态性时只使用了一个限制性内切酶（*Eco*RI），因此，目前所得到的关于蛋白质和等位基因多态性的数据有可能是被低估的。从已发表的酯酶 β 基因区的限制性酶切图谱上看[3]，至少还有 12 个限制性内切酶可用来检测 $\beta 1^1$ 基因另外的多态性。如使用两个限制性内切酶就能区分出使用单个酶（如 *Eco*RI）所无法分开的相似的多态性条带。

（4）迁移假说：迁移假说可较好地解释现有的分子数据。该假说是基于：①在敏感种群中围绕酯酶 β 结构基因存在较大的中性多态性。②地理区域相距较远的种群中存在相同的扩增单基因型。已通过对英国、比利时、法国北部敏感种群蚊虫的研究发现，在 DNA 水平，从法国种群（$n=74$）和英国种群（$n=50$）中分别发现了 18 和 16 个等位基因；在 DNA 水平，使用一个限制性内切酶（*Eco*RV），从一个种群（$n=72$）的蚊虫中发现在酯酶 β 位点存在 24 个等位基因[2]；从来自南美缺乏扩增的 9 个 PUNTA 蚊虫种群中至少发现了 8 个等位基因[10]；我们对北京敏感蚊虫的研究结果也得到了同样的结论（在 15 只蚊虫中发现了 5 个等位基因）。从理论上说这样大的多态性的存在，使得相同单基因型在两个不同的地理区域变成扩增型的可能性很小。因此，我们认为，基因的扩增首先产生于一个特定的地区，然后扩散到世界各地。

北京敏感蚊虫已在室内培养了 30 多年，饲养过程中严格与杀虫剂隔离。虽然 30 年前缺乏对北京野外蚊虫种群酯酶的研究，但对敏感蚊虫种群的研究可以发现，在北京敏感种群中存在着产生酯酶 $\beta 1^1$ 扩增的 DNA 基础：即在其酯酶 β 基因周围存在着大量的中性多态性。以后由于长期使用有机磷杀虫剂对敏感种群选择而产生 $\beta 1^1$ 基因的扩增。扩增出现后，杀虫剂选择压力的存在使得扩增维持在一定的水平。

致谢 法国科学院科学与进化研究所 Raymond 教授惠赠致倦库蚊 Tem-R 系，酯酶 $\beta 1^1$ 的标准品系；致倦库蚊 Selax 系，酯酶 $\alpha 2/\beta 2$ 的标准品系。山东省寄生虫病防治研究所甄天民教授赠送中华按蚊敏感品系。军事医学科学院流行病研究所赠送三带喙库蚊敏感品系。

参 考 文 献 (References)

[1] Gargan III T P, Barr A R. Inheritance of an esterase locus in *Culex pipiens*. Ann. Entomol. Soc. Am., 1977, 70: 402～408

[2] Raymond M, Qiao C L, Callaghan M. Easterase polymorphism in insecticide susceptible populations of the mosquito *Culex pipiens*. Genet. Res., 1996, 67: 19～26

[3] Raymond M, Callaghan A, Fort P *et al*. Worldwide migration of amplified in insecticide resistance genes in mosquitoes. Nature , 1991, 350: 151～153

[4] Guillemaud T, Rooker S, Pasteur N *et al*. Testing the unique amplification event and the worldwide migration hypothesis of insecticide resistance genes with sequence data. Heredity, 1996, 77: 535～543

[5] Rooker S, Guillemaud T, Pasteur N *et al*. Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in *Culex pipiens*

mosquitoes. Heredity, 1996, 77: 555～561
[6] Wirth M C, Marquine M, Geoghiou G P *et al*. Esterase A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): role in organophosphate resistance and linkage studies. J. Med. Entomol., 1990, 27: 202～206
[7] Raymond M, Pasteur N. The amplificátion of B1 esterase genes in the mosquito *Culex pipiens* is present in gametes. Nucleic. Acids. Res., 1989, 17: 7 116
[8] Pasteur N, Pasteur G, Catalan J *et al*. Practical Isozyme Genetics. Ellis Hrwood Lmd, Chister, England. 1988
[9] Raymond M, Pasteur N, Georghiou G P *et al*. Detoxification esterases new to California, USA, in organophosphate-resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol., 1987, 24: 24～27
[10] Qiao C L, Raymond M. The same esterase B1 haplotype is amplified in insecticide-resistance genes in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex from America and China. Heredity, 1995, 74: 339～345
[11] 陆宝麟. 中国重要医学动物鉴定手册. 北京：人民卫生出版社. 1982, 1～159

Esterase polymorphism in insecticide susceptible populations of the mosquitoes

CHEN Li-ping, QIAO Chuan-ling*
(State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects & Rodents,
Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: Three susceptible mosquito populations from China were analyzed for esterase haplotype polymorphism by starch gel electrophoresis and RFLP analysis. At the protein level, 2 and 3 alleles were found for esterase α and β respectively in a *Culex tritaeniorhynchus* population ($n=54$), at the DNA level, with the use of one restriction enzyme (*Eco*RI), only 2.9% individuals were detected sharing a 1.3 kb single copy band which is homologous with the 1.3 kb cDNA fragment of esterase $\beta 1^1$ gene. In a *Anopheles sinensis* population ($n=50$) with non-specific esterase of low activity, 1 allele was detected for esterase α and esterase β, at DNA level, no band was found homologous to $\beta 1^1$ gene. In a *Culex pipiens* strain of Beijing susceptible population, 5 alleles were found separately for esterase α and β at protein level, 5 alleles at the esterase β locus were detected in a sample of 15 mosquitoes from one population, with the use of only one restriction enzyme. A unique amplification event prior to extensive migration of esterase β haplotype seems the most likely hypothesis to explain the molecular data from Beijing susceptible population. This hypothesis is based on: ① the existence of much neutral polymorphism around the esterase β structural gene in susceptible mosquitoes, and ② the presence of the same amplified haplotype in populations from geographical areas far apart. The first point is supported by this study on population from Beijing. The polymorphism found around the esterase gene is probably neutral to OP insecticides, so that two distinct amplification, even of the same esterase gene/allele, will probably generate two distinct amplified haplotypes. Once a haplotype has been amplified and spread in treated populations, some copies may accumulate mutations. This may generate some polymorphism in linkage disequilibrium with the other copies, as described for the $\beta 1^1$ amplification. If such polymorphism is sufficiently large, it will probably allow us to reconstruct the various historical events for each of the four amplified esterases.

Key words: mosquito; esterase; organophosphate insecticide; RFLP; gene amplification; migration

* Author for correspondence